Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalons) auf lymphatische Zellen in vivo

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
FRIEDRICH WÖRZ
aus Bad Urach-Hengen

1984

UNIV.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0014

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalons) auf lymphatische Zellen in vivo

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
FRIEDRICH WÖRZ
aus Bad Urach-Hengen

1984

Dekan:	Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter:	Privatdozentin Dr. E. Heidemann
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Wilms

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas möchte ich Frau Dr. Else Heidemann danken.
Durch ihren Rat und ihre immer freundliche und engagierte Mithilfe unterstützte sie meine Arbeit.
Auch Fräulein Nevenka Podgornik möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe im Labor herzlich danken.

Verwendete Abkürzungen

$Ü_{30}$	=	teilweise gereinigter Kalbsmilzextrakt (Fraktion, die bei der Membranfiltration entsteht, Molekulargewicht zwischen 30 000 und 50 000)
K	=	Bezeichnung der Kontrolltiere
$Ü_{0,5}$	=	Tier ist behandelt mit 0,5 mg $Ü_{30}$
$Ü_{1,0}$	=	Tier ist behandelt mit 1,0 mg $Ü_{30}$
$Ü_{2,0}$	=	Tier ist behandelt mit 2,0 mg $Ü_{30}$
cpm	=	Impulse pro Minute bei ^{3}H-Thymidin-Einbaumessungen
^{3}H-TDR	=	Tritium - markiertes Thymidin
i.p.	=	intraperitoneal
i.v.	=	intravenös
p.t.	=	post transplantationem
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
PHA	=	Phytohämagglutinin
TC 199-M.	=	Gewebekulturmedium
RPMJ 1640-Medium	=	Gewebekulturmedium

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methodik	4
2.1.	Präparation des Inhibitors	4
2.2.	In vivo - Versuch	5
2.2.1.	Beschreibung der Versuchstiere	5
2.2.2.	Transplantation der Thymuszellen	5
2.2.3.	Behandlung der Tiere mit einem membrangereinigten Kalbsmilzextrakt $Ü_{30}$ und ^3H-Thymidinmarkierung	6
2.2.4.	Aufarbeitung der Tiere	6
2.3.	Thymuszellkultur nach in vivo-Behandlung	7
2.4.	Signifikanzberechnungen	8
3.	Ergebnisse	9
3.1.	Dosiabhängigkeit der $Ü_{30}$-Wirkung bei i.v.-Gabe	9
3.2.	Zeitabhängigkeit der $Ü_{30}$-Wirkung bei i.v.-Gabe	15
3.3.	Ergebnisse bei i.p.-Gabe von $Ü_{30}$	18
3.4.	Thymuszellkulturen nach nach in vivo-Behandlung mit $Ü_{30}$	20
4.	Diskussion	25
5.	Zusammenfassung	33

1. E I N L E I T U N G

Die Beobachtung des Gleichgewichtes zwischen Zelluntergang und Zellwachstum im gesunden erwachsenen Organismus führte zu vielen Theorien über die Regulation des Zellwachstums. Es wurden sowohl Wachstumsstimulatoren, die bei Unterschreiten einer bestimmten Organgröße gebildet werden, als auch Wachstumsinhibitoren, welche bei Überschreiten einer gegebenen Organgröße eingreifen, postuliert. (1)
Simms und Stillman beschrieben schon 1937 einen Wachstumsinhibitor, den sie aus Hühner-, Hunde- und Schafaorta gewonnen hatten. Sie postulierten einen von Zellen gebildeten und im umgebenden Interzellularraum gespeicherten Hemmstoff. (26)
Bullough und Laurence veröffentlichten 1960 Ergebnisse, wonach einem Epidermisextrakt mitosehemmende Wirkung zuzuschreiben ist. (4) Sie nannten den postulierten Inhibitor "Chalon". Moorhead et al (23) und Jones et al (17) wendeten das Chalonkonzept auf das Lymphozytensystem an. Sie konnten zeigen, daß durch Extrakte von Schweinelymphknoten die morphologisch demonstrierbare Transformation von PHA-stimmulierten menschlichen Lymphozyten, wie auch die Fähigkeit dieser Zellen, ^{3}H-Thymidin einzubauen, gehemmt wurden. Diese Hemmung war nicht zytoloxisch; die extrahierte Substanz hatte ein Molekulargewicht von 50 000 - 75 000. Die Existenz eines spezifischen und endogenen Mitosehemmers der Lymphozytentransformation wurde durch Garcia-Giralt et al (9) und von Houck et al (15) bestätigt.

Die Definition der Chalone wurde auf dem Internationalen Symposium über Chalone in Geilo, Norwegen, im Oktober 1978 erneut diskutiert. Dabei wurde festgehalten:

- ein Chalon ist ein endogener Inhibitor;
- er wirkt bevorzugt auf das Gewebe, aus dem er extrahiert wurde;
- er ist wahrscheinlich artunspezifisch
- er wirkt nicht toxisch ;
- seine Wirkung ist reversibel.

Hypothetisch werden bis jetzt 3 Anwendungsmöglichkeiten der Chalone in der Therapie gesehen:

1. Chalone hemmen evtl. das Wachstum von Neoplasien direkt. Dabei würde es sich gegenüber den Zytostatika um eine gezieltere Hemmung handeln, da das für das spezielle entartete Gewebe benötigte Chalon gegeben wird,welches gewebsspezifisch wirkt.
2. Chalone könnten als synchronisierendes Adjuvans in der Krebstherapie neben Bestrahlung und Zytostatika angewandt werden. Iversen (16) sieht die Möglichkeit, die Zellen durch Chalon vor einer für Bestrahlung und Zytostatika besonders sensiblen Zellzyklusphase zu arretieren. Da die malignen Zellen auf die Chalonhemmung weniger ansprechen als die normalen, müßte es möglich sein, so zu dosieren, daß die gesunden Zellen noch blockiert sind, während die malignen schon proliferieren und damit angreifbar sind. Hier müßte dann die Bestrahlung oder auch die Zytostatikatherapie einsetzen.
3. Chalone könnten evtl. zur Verhinderung der Graft-versus-host reaction (GVHR) eingesetzt werden. Die Gruppe um Garcia-Giralt (10,11) hat an Mäusen gezeigt, daß ein teilweise gereinigter Kalbsmilzextrakt vorbeugend gegen die GVHR wirkt und daß bei bestehender GVHR diese durch Gabe des Kalbsmilzextraktes unter Kontrolle gebracht werden kann. Daraus könnte sich die Möglichkeit ergeben, eines Tages unerwünschte Immunreaktionen beim Menschen evtl. mit Lymphozytenchalon zu behandeln.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein teilweise gereinigter Kalbsmilzextrakt, den E.Heidemann et al. (12) als lympozytenspezifischen Hemmstoff in vitro beschrieben haben, im Tierversuch in vivo untersucht werden. Die Wirksamkeit des Extraktes sollte am Ausmaß der Proliferationshemmung der Thymuszellen von AKR-Mäusen, denen zuvor syngene Leukämiezellen transplantiert worden waren, gemessen werden. Als Parameter für die Thymuszellproliferation wurden die Thymuszellzahl und der ^{3}H-Thymidineinbau (in die Thymuszellen) bestimmt.
Es wurde ferner die Konzentrationsabhängigkeit (0,5 - 1 - 2 mg des Extraktes pro Tier) und die Zeitabhängigkeit (8 u. 24 Stunden Einwirkungszeit) der Extraktwirkung untersucht. Zudem wurde nach einer 24-stündigen Einwirkungszeit des Kalbsmilzextraktes auf die Thymuszellen in vivo durch einen sich anschließenden in-vitro-Versuch die fortgesetzte Proliferationshemmung dieser Zellen gemessen.

2. METHODIK

2.1. Präparation des Inhibitors

Nach der von E. Heidemann, A. Jung und K. Wilms beschriebenen Anreicherungsmethode (12) wurde der Milzextrakt ($Ü_{30}$) präpariert.

Die Kalbsmilzen (im Mittel 450 g) von ca. 10 Wochen alten frisch geschlachteten Kälbern transportierten wir vom Schlachthof zum Labor in eisgekühlter physiolog. Kochsalzlösung. Die Milzaufarbeitung wurde dann im Kühlraum bei einer Temperatur von 6° C vorgenommen. Im Waring-Blendor erfolgte die Homogenisation.

Zu 400 ml Homogenat gab man 600 ml eiskaltes Azeton p.a.. Durch Zugabe von Trockeneis wurde die Temperatur des Homogenats während dieses Arbeitsganges unter 6° C gehalten. Indem man das Homogenat durch einen Mullstrumpf preßte, konnten die bindegewebigen Teile abgetrennt werden. Nach 60 Minuten erfolgte die Abtrennung des Überstandes auf einer Stockzentrifuge (mit etwas 1050 g). Das Sediment wurde mit Azeton nachgewaschen, in 1 Liter eiskaltes Aqua bidest aufgenommen und 16 Stunden lang gerührt. Durch einstündige Zentrifugation bei 30 000 g wurden feste Bestandteile abgetrennt. Den Überstand aus der Ultrazentrifuge filtrierte man dann durch eine Amicon-Membran XM 50. Das Filtrat(nominales MG 50 000) gaben wir auf eine Amicon PM 30-Membran. Die PM 30-Membran hielt Moleküle mit einem nomialen MG 30 000 zurück. Das Filtrat der PM 30-Filtration wurde verworfen. Der Rückstand dieser zweiten Filtration ($Ü_{30}$ = Überstand der PM 30-Membran) wurde 48 Stunden gegen Wasser dialysiert, dann lyophilisiert und schließlich bei -18° C in der Gefriertruhe aubewahrt.

2.2. in vivo - Versuch

2.2.1. Beschreibung der Versuchstiere

Die Versuche wurden an 6 - 8 Wochen alten weiblichen AKR/A/BOM spf - Mäusen durchgeführt.
Die Tiere wurden im Alter von etwa 4 Wochen vom "Laboratory animals breeding and research Centre Gl. Bomholtgard L + d 8680 Ry - Denmark" bezogen.
Bis zum Versuchsbeginn hatten sie etwa 2 Wochen Zeit zur Akklimatisation. (28) Die Tiere hatten ein Durchschnittsgewicht von 21,9 g. Es wurde darauf geachtet, daß für die Kontrolltiergruppe und für die Gruppe der $Ü_{30}$ behandelten Tiere etwa gleiche Durchschnittsgewichte eingehalten wurden. Die mit $Ü_{30}$ behandelten Tiere und die Kontrolltiere wurden gemischt gehalten. Es wurde normales Leitungswasser verabreicht. Als Futter wurde das Standardfutter Altromin 1324 (Altromin - GmbH, Lage) gegeben.

2.2.2. Transplantation der Thymuszellen

Den 6 - 8 Wochen alten Mäusen wurden jeweils 10^6 Thymuszellen einer ca. 10 Monate alten Maus mit spontaner lymphatischer Leukämie in die Schwanzvene injiziert. In Versuch A diente eine Maus als Zellspender, die eine transplantierte Leukämie hatte (1.Passage).
Die Diagnose der Leukämie stellten wir durch Palpation der inguinalen Lymphknoten. Wenn die Leukämiemaus erbsgroße Lymphknoten aufwies, verwendeten wir sie als Spendertier. Die Tiere zeigten meist auch eine bucklige Sitzhaltung, ein struppiges Fell und gerötete Augen.
Die Präparation der Thymuszellen erfolgte wie unter 2.2.4. beschrieben. Die zu injizierende Zellsuspension enthielt $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml physiologische Kochsalzlösung.

2.2.3. Behandlung der Tiere mit einem membrangereinigten Kalbsmilzextrakt $Ü_{30}$ und ^{3}H-Thymidinmarkierung

48 Std. post transplantationem applizierten wir den in jeweils 0,2 ml physiolog. Kochsalzlösung gelösten Kalbsmilzextrakt nach Sterilfiltration (Milliporefilter, Porengröße 0,22 µm, Millipore S.A. 78530 BUC,FRANCE). Zur Feststellung einer evtl. Dosisabhängigkeit der Wirkung verabreichten wir Dosen von 0,5 mg, 1,0 mg und 2,0 mg je Tier. Im Versuch A - F erfolgte die Applikation intravenös, in Versuch G intraperitoneal. Die Kontrolltiere erhielten jeweils 0,2 ml physiolog. Kochsalzlösung in derselben Weise wie die extraktbehandelten Tiere.
Zur radioaktiven Markierung der Lymphozyten in vivo wurden 48 h post transplantationem 120 µCi 6-^{3}H-Thymidin pro Tier intraperitoneal appliziert (22,24). 6-^{3}H-Thymidin lag uns als wässrige Lösung vor (5 mCi in 5 ml), die wir im Verhältnis 1:1 mit physiolog. NaCl-Lösung verdünnten.
In unseren Versuchen C und D wurde der ^{3}H-Thymidineinbau in den Thymuszellen nach 8 und 24 Stunden gemessen. In den übrigen Versuchen wurde der ^{3}H-Thymidineinbau ausschließlich nach 24 Stunden bestimmt.

2.2.4. Aufarbeitung der Tiere

72 Stunden nach der Zelltransplantation wurde der Situs der Mäuse durch Bauch-Thorax-Längsschnitt mit Verlängerung des Schnitts zu allen Extremitäten eröffnet. Der entnommene Thymus wurde (steril) mit einer Schere zerkleinert und mit 20 ml physiolog. Kochsalzlösung (bei Versuch E u. F mit RPMI-1640-Medium) durch ein engmaschiges Zellsieb (Werkstoff Nr. 4301 der Firma Weisse und Eschrich GmbH, 8642 Ludwigsstadt) gespült. Die Zellen der so entstandenen Zellsuspension wurden nach Färbung mit Türkscher Lösung gezählt.

Zur Messung des in den Zellen incorporierten ^{3}H-Thymidins wurden jeweils 2 ml der Zellsuspension auf einen Glasfaserfilter (Whatman, Springfield, Maidstone, England, GF/C, 2,5 cm) pipettiert. Anschließend folgten 10 ml eiskalte physiolog. Kochsalzlösung, dann 10 ml 5% ige Trichloressigsäure, danach 10 ml 0,1 N Salzsäure.
Die Filter, die jetzt die DNA der Zellen enthielten, wurden nach dem Filtrationsvorgang mit einer Pinzette von der Absaugflasche genommen und in ein Szintillatorröhrchen (20 ml) gegeben. Nach Trocknung wurden die Filter mit dem Gewebelösungsmittel Soluene (NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain) gelöst. Vor der Aktivitätsmessung wurden der Soluene-Filter-Lösung noch 15 ml Szintillator-Flüssigkeit (98% Tuluol + 2% Omifluor (NEN Chemicals) zugegeben. Die Anzahl der Impulse pro Minute (=cpm) wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb Packard Instruments, Frankfurt/M.) bestimmt.

2.3. Thymuszellkultur nach in vivo-Behandlung

Thymuszellen von, wie unter 2.2.2. und 2.2.3. beschrieben, behandelten Mäusen (Gewinnung s. 2.2.4.) wurden in folgendem Kulturmedium in einer Zelldichte von 2700/µl weitergezüchtet:

80% TC-199-Medium:
(v. DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA)
+ 20% foetales Kalbsserum
(Microbiol. Ass. Bethesda, Maryland, USA)
+ 100 000 IE Penicillin G/500 ml
+ 100 000 µg Streptomycin/500 ml

Der ph-Wert der Mischung wurde durch Zugabe von Bicarbonat auf 7,4 eingestellt (Umschlagspunkt Phenolrot). 1 ml dieser Zellsuspension wurde in 12 ml fassenden sterilen Polypropylenröhrchen (RR, nat., 17,0/77 mm, Spezialstopfen stückweise verpackt von Firma Greiner, Nürtingen) mit wäßriger ^{3}H-Thymidinlösung versetzt (Endkonzentration 1 µCi/ml). Jeweils zwei Proben pro Versuchstier wurden luftdicht verschlossen und schräg liegend bei 37° C 5 1/2 Stunden lang inkubiert. Danach wurde der Thymidineinbau durch Eintauchen der Reagenzgefäße in ein Eisbad gestoppt und anschließend, wie unter 2.2.4. beschrieben, im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die dritte Probe diente als sog. Thymidin-Leerwert für die beiden ersten; sie enthielt dementsprechend nur 1 ml Zellsuspension, also kein ^{3}H-Thymidin.

2.4. Signifikanzberechnungen

Signifikanzberechnungen wurden nach dem Prinzip von Wilcoxon (29) durchgeführt. Da die Durchschnittswerte der einzelnen Versuchseinheiten variierten, wurden die Einzelergebnisse auf den Durchschnittswert der Kontrolltiere der jeweiligen Versuchseinheit bezogen. Die sich daraus ergebenden Prozentwerte wurden nach Wilcoxon geordnet.

3. E R G E B N I S S E

Insgesamt wurden in 9 Einzelversuchen 114 Tiere (50 Kontrolltiere und 64 mit $Ü_{30}$ behandelte Tiere) aufgearbeitet. In den folgenden Tabellen sind sowohl sämtliche Einzelergebnisse der Untersuchung, als auch die Durchschnittsergebnisse der jeweiligen Versuchsgruppe zusammengestellt. Die durchschnittlichen Ergebnisse der Versuchsgruppe sind außerdem in Schaubildern dargestellt.

3.1. Dosisabhängigkeit der $Ü_{30}$-Wirkung bei i.v.-Gabe:

Nach intravenöser Verabreichung von 0,5 mg membrangereinigten Milzextraktes $Ü_{30}$ pro Tier war die Zellproliferation im Thymus um durchschnittlich 30,2% gehemmt. (vgl. Abb.1 und Tab.1) Bei Steigerung der Dosis war diese Hemmung vermindert.
Der Thymidineinbau verhielt sich ähnlich. Die Hemmung betrug bei Gabe von 0,5 mg $Ü_{30}$ im Mittel 29,5%. Die Tabellen 1 und 2 fassen die Versuche A - F zusammen; in ihnen sind die Mittelwerte der jeweiligen Versuche aufgeführt. In den Tabellen 3 - 5 sind die einzelnen Tiere aufgelistet. In 6 Einzelversuchen wurden insgesamt 65 Tiere (27 Kontrolltiere, 38 mit $Ü_{30}$ behandelte Tiere) aufgearbeitet.

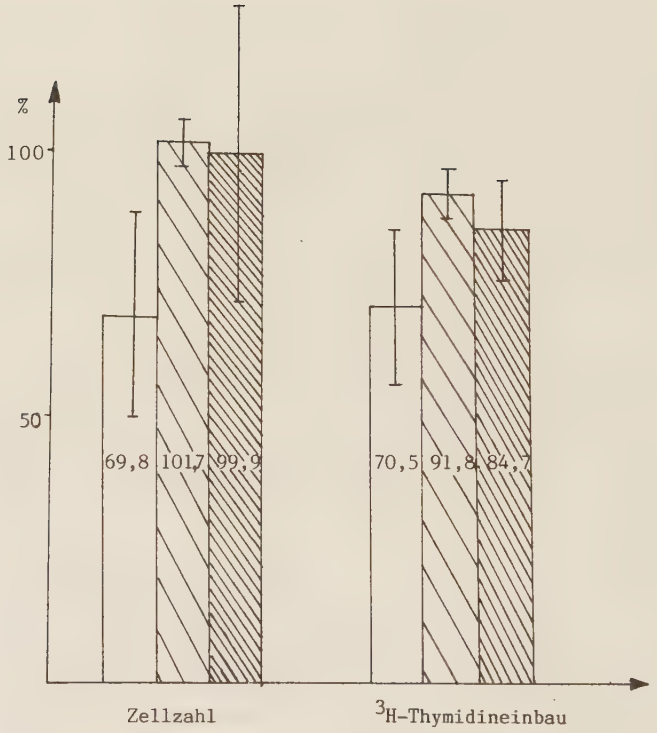

Abb.1: Zellzahl und Thymidineinbau im Thymus von AKR-Mäusen mit transplantierter lymphatischer Leukämie nach 24-stündiger Einwirkung von teilweise gereinigtem Milzextrakt $Ü_{30}$.
100 % ≙ Zellzahl, bzw. ^{3}H-Thymidineinbau bei den Kontrolltieren

□ ≙ Zellz., bzw. ^{3}H-Thymidineinbau nach 0,5 mg $Ü_{30}$
▨ ≙ Zellz., bzw. ^{3}H-Thymidineinbau nach 1 mg $Ü_{30}$
▨ ≙ Zellz., bzw. ^{3}H-Thymidineinbau nach 2 mg $Ü_{30}$

Dargestellt sind einerseits Mittelwert ± Standardabweichung aus den Versuchen H-F (vgl. Tab. 3 - 4).

Tabelle 1

V	Kontrollen		Behandelt mit $\ddot{U}_{30}$						Relation Behandelt/Kontrolle in % bei:		
			0,5 mg		1,0 mg		2,0 mg				
	n	Zell-zahl/µl	n	Zell-zahl/µl	n	Zell-zahl/µl	n	Zell-zahl/µl	0,5 mg	1,0 mg	2,0 mg
A	4	9187	2	7500	-	-	-	-	81,6	-	-
B	3	15116	3	7841	-	-	-	-	51,9	-	-
C	4	7625	4	6275	-	-	-	-	82,5	-	-
D	5	13595	5	7325	-	-	-	-	53,9	-	-
E	6	11050	4	5918	4	11588	4	8819	53,6	1o4,9	79,8
F	5	10075	4	9644	4	9931	4	12081	95,7	98,6	120,0
Mittelwert aller Versuche A-F									69,8	101,7	99,9
Standardabweichung									±19	±4,5	±28,4

Tabelle 1: Thymuszellzahl/1µl Zellsuspension nach 24-stündiger Einwirkung von teilweise gereinigtem Milzextrakt $\ddot{U}_{30}$(1ml Zellsuspension ≙ 1/20 des ganzen Tymus).

Tabelle 2

V	Kontrollen		Behandelt mit $\ddot{U}_{30}$						Relation Behnadelt/Kontrolle in % bei:		
			0,5 mg		1,0 mg		2,0 mg				
	n	cpm	n	cpm	n	cpm	n	cpm	0,5 mg	1,0 mg	2,0 mg
A	4	15678	2	9396	-	-	-	-	59,9	-	-
B	3	21818	3	13866	-	-	-	-	63,6	-	-
C	4	16048	4	11880	-	-	-	-	74,0	-	-
D*	5	17744	5	14830	-	-	-	-	83,0	-	-
E	6	19348	4	11828	4	18363	4	15051	61,0	95,0	78,0
F	5	18021	4	14729	4	15974	4	16463	81,7	88,6	91,4
Mittelwert aller Versuche A-F									70,5	91,8	84,7
Standardabweichung									±10,4	±4,5	±9,6

Tabelle 2: ^{3}H-Thymidineinbau in Thymuszellen nach 24-stündiger Einwirkung von teilweise gereinigtem Milzextrakt $\ddot{U}_{30}$(1ml Zellsuspension ≙ 1/20 des ganzen Thymus).

V = Versuchsbezeichnung
cpm = Impulse pro Minute
n = Anzahl der Versuchstiere
$\ddot{U}_{30}$ = teilweise gereinigter Kalbsmilzextrakt
* = bei Versuch D wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen transplantiert

Tabelle 3

Versuchs-bez.	K o n t r o l l t i e r e			mit 0,5 mg $Ü_{30}$ behandelte Tiere			% Hemmung	
	lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymi-dineinbau (cpm)	Zell-zahl/µl	lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymi-dineinbau (cpm)	Zell-zahl/µl*	T	Z
A	K_1	18534	12325	$Ü_1$	14056	10125		
	K_2	19686	8775	$Ü_2$	4724	4875		
	K_3	15378	9750					
	K_4	9114	5875					
	M.W.	15678	9187	M.W.	9390	7500	59,8	81,6
B	K_1	21167	13075	$Ü_1$	9931	5775		
	K_2	25662	19825	$Ü_2$	11356	7750		
	K_3	18627	12450	$Ü_3$	20312	10000		
	M.W.	21818	15117	M.W.	13866	7841	63,5	31,8
C	K_1	20813	11050	$Ü_1$	16663	6725		
	K_2	12946	6950	$Ü_2$	13190	5000		
	K_3	8287	4725	$Ü_3$	6265	8000		
	K_4	22147	7775	$Ü_4$	11404	5375		
	M.W.	16048	7625	M.W.	11880	6275	71,0	82,5

Tabelle 3: Einzelwerte von ^{3}H-Thymindineinbau und Zellzahl aus den Versuchen A-C.

cpm = Impulse pro Minute
M.W.= Mittelwert aus der jeweiligen Versuchsgruppe
* = 1 ml ≙ 1/20 des Thymus(s.o.)
T = ^{3}H-Thymindineinbau
Z = Zellzahl

Tabelle 4

V	lfd.Nr. der Tiere	Counts per minute Probe a	Probe b	Mittelwert	Zell-zahl/µl*	% Hemmung T	Z
D	K_1	11971	12571	12271,0	9875		
D	K_2	10765	12510	11637,5	7750		
D	K_3	14612	14784	14698,0	11575		
D	K_4	12328	24404	24866,0	14075		
D	K_5	25046	25450	25248,0	14700		
	M.W.K_1-K_5			17744	13595		
D	$\ddot{U}_{0,5-1}$	19365	-	19365,0	8425		
D	$\ddot{U}_{0,5-2}$	11455	11262	11358,5	6600		
D	$\ddot{U}_{0,5-3}$	9817	9705	9761,0	6425		
D	$\ddot{U}_{0,5-4}$	16744	15926	16335,0	7050		
D	$\ddot{U}_{0,5-5}$	17752	16914	17333,0	8125		
	M.W.$\ddot{U}_1$-$\ddot{U}_5$			14830	7325	83,5	53,8
E	K_1	14395	14451	14423,0	6225		
E	K_2	21176	20521	20848,5	12900		
E	K_3	10713	10465	10583,0	7100		
E	K_4	19300	19412	19356,0	13825		
E	K_5	27159	-	27159,0	11000		
E	K_6	23575	23851	23713,0	15250		
	M.W.K_1-K_6			19348,0	11050		
E	$\ddot{U}_{0,5-1}$	19542	17797	18169,5	7250		
E	$\ddot{U}_{0,5-2}$	11900	11888	11894,0	4400		
E	$\ddot{U}_{0,5-3}$	6599	7033	6816,0	4450		
E	$\ddot{U}_{0,5-4}$	10411	10454	10432,5	7575		
	M.W.$\ddot{U}_1$-$\ddot{U}_4$			11828,0	5918	61,1	53,5
E	$\ddot{U}_{1,0-1}$	15565	15556	15560,5	13875		
E	$\ddot{U}_{1,0-2}$	15759	15669	15714,0	8575		
E	$\ddot{U}_{1,0-3}$	23043	23711	23377,0	14200		
E	$\ddot{U}_{1,0-4}$	19147	18450	18798,5	9700		
	M.W.$\ddot{U}_1$-$\ddot{U}_4$			18363	11587,5	94,9	104,2
E	$\ddot{U}_{2,0-1}$	10363	10614	10488,5	5875		
E	$\ddot{U}_{2,0-2}$	13467	13447	13457,0	7500		
E	$\ddot{U}_{2,0-3}$	16132	15926	16029,0	7950		
E	$\ddot{U}_{2,0-4}$	20279	20180	20229,5	13950		
	M.W.$\ddot{U}_1$-$\ddot{U}_4$			15051	8818,75	77,7	79,8

Tabelle 4: Einzelwerte von ^{3}H-Thymidineinbau und Zellzahl aus Versuch D und E.

M.W. = Mittelwert aus der jeweiligen Versuchsgruppe
K... = Kontrolltierbezeichnung
$\ddot{U}_{0,5}$.. = Tierbezeichnung (mit 0,5 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\ddot{U}_{1,0}$.. = Tierbezeichnung (mit 1,0 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\ddot{U}_{2,0}$.. = Tierbezeichnung (mit 2,0 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
* = 1 ml ≙ 1/20 des Thymus (s.o.)
T = Thymidineinbau
Z = Zellzahl

Tabelle 5

V	lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau(cpm) Probe a	Probe b	Mittelwert	Zell-zahl/µl*	% Hemmung T	Z
F	K_1	10105	9646	9875,5	5575		
F	K_2	8485	11260	9872,5	5850		
F	K_3	25842	25886	25864,0	12400		
F	K_4	18956	19288	19122,0	10650		
F	K_5	25258	25489	25373,5	15900		
	M.W.			18021	10075		
F	$Ü_{0,5-1}$	8457	8634	8545,5	6250		
F	$Ü_{0,5-2}$	20820	20635	20727,5	10475		
F	$Ü_{0,5-3}$	12907	12666	12768,5	10100		
F	$Ü_{0,5-4}$	16852	16870	16861,0	11750		
	M.W.			14729	9644	81,7	95,7
F	$Ü_{1,0-1}$	11725	11955	11840,0	7950		
F	$Ü_{1,0-2}$	15311	14898	15104,5	10450		
F	$Ü_{1,0-3}$	12110	11478	11794,0	6350		
F	$Ü_{1,0-4}$	23897	26419	25158,0	14975		
	M.W.			15974	9931	88,6	98,6
F	$Ü_{2,0-1}$	12007	11924	11965,5	8075		
F	$Ü_{2,0-2}$	18844	-	18844,0	18025		
F	$Ü_{2,0-3}$	8334	-	8334,0	4400		
F	$Ü_{2,0-4}$	26809	26608	26708,5	17825		
	M.W.			16463	12081	91,4	119,9

Tabelle 5: Einzelwerte von ^{3}H-Thymidineinbau aus Versuch F.

M.W. = Mittelwert aus der jeweiligen Versuchsgruppe
K... = Kontrolltierbezeichnung
$Ü_{0,5..}$ = Tierbezeichnung(mit 0,5 mg $Ü_{30}$ behandelt).
$Ü_{1,0..}$ = Tierbezeichnung(mit 1,0 mg $Ü_{30}$ behandelt).
$Ü_{2,0..}$ = Tierbezeichnung(mit 2,0 mg $Ü_{30}$ behandelt).
cpm = Counts per minute
* = 1 ml ≙ 1/20 des Thymus(s.o.)
T = Thymidineinbau
Z = Zellzahl

3.2. Zeitabhängigkeit der $Ü_{30}$-Wirkung bei i.v.-Applikation

8 Std. nach Verabreichung von 0,5 mg des teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes $Ü_{30}$ wurde ein unveränderter ^3H-Thymidineinbau in den Thymuszellen gemessen. Dagegen war nach 24 Std. bei den mit $Ü_{30}$ behandelten Tieren eine Hemmung des ^3H-Thymidineinbaus um 20,4% gegenüber den nicht behandelten zu verzeichnen. (vgl. Abb.2). Hierbei wurden in 2 Einzelversuchen insgesamt 36 Mäuse (18 Kontrolltiere, 18 mit $Ü_{30}$ behandelte Tiere) aufgearbeitet. (vgl. Tab. 6 und 7).

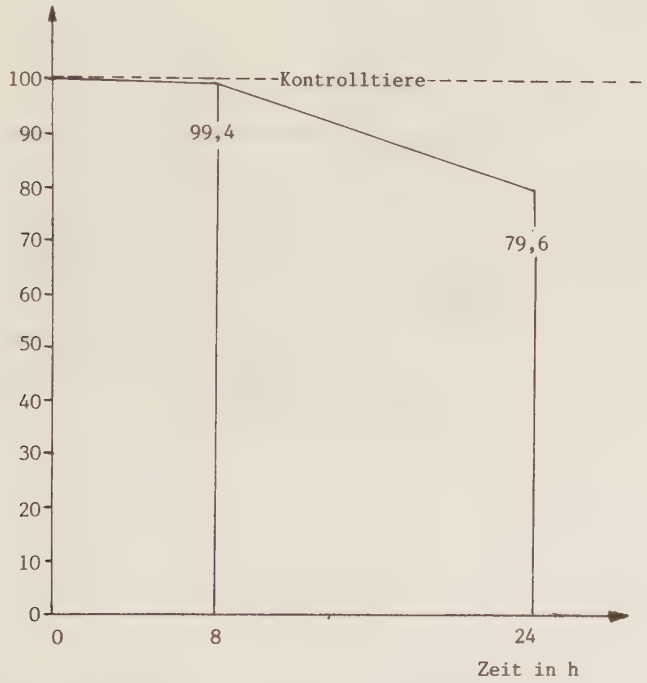

Abb. 2: ^3H-Thymidineinbau im Thymus von AKR-Mäusen mit transplantierter lymphatischer Leukämie 8 bzw. 24 Std. nach intravenöser Applikation von $Ü_{30}$ in % der Kontrolle.

Tabelle 6

Versuchs-bezeichnung	K o n t r o l l t i e r e		Mit 0,5 mg $Ü_{30}$ behandelte Tiere	
	lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau(cpm) pro 2 ml Zellsuspension*	lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau(cpm) pro 2 ml Zellsuspension*
Ia	K_1	14360	$Ü_1$	14314
	K_2	10562	$Ü_2$	10007
	K_3	17637	$Ü_3$	16804
	K_4	10306	$Ü_4$	15281
	M.W.	13216	M.W.	14101
IIa	K_1	15534	$Ü_1$	8708
	K_2	8765	$Ü_2$	18186
	K_3	12187	$Ü_3$	10062
	K_4	13422	$Ü_4$	13623
	K_5	15872	$Ü_5$	11009
	M.W.	13156	M.W.	12317
M.W.(Ia und IIa)		13182		13109

Tabelle 6: ^{3}H-Thymidineinbau im Thymus von AKR-Mäusen mit transplantierter lymphatischer Leukämie 8 Stunden nach intravenöser Applikation von $Ü_{30}$.

M.W. = Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe
cpm = Impulse pro Minute
* = 1 ml ≙ 1/20 des Thymus(s.o.)

Tabelle 7

Versuchs-bezeichnung	K o n t r o l l t i e r e lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau(cpm) pro 2 ml Zellsuspension*	Mit o,5 mg $Ü_{30}$ behandelte Tiere lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau(cpm) pro 2 ml Zellsuspension*
Ib	K_1	20813	$Ü_1$	16663
	K_2	12946	$Ü_2$	13190
	K_3	8287	$Ü_3$	6265
	K_4	22147	$Ü_4$	11404
	M.W.	16048	M.W.	11880
IIb	K_1	12271	$Ü_1$	19365
	K_2	11637	$Ü_2$	11359
	K_3	14698	$Ü_3$	9761
	K_4	24866	$Ü_4$	16335
	K_5	25248	$Ü_5$	17332
	M.W.	17744	M.W.	14830
M.W.(Ib und IIb)		16990,2		13518,9

Tabelle 7: ^{3}H-Thymidineinbau im Thymus von AKR-Mäusen mit transplantierter lymphatischer Leukämie 24 Stunden nach intravenöser Applikation von $Ü_{30}$.

M.W. = Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe
cpm = Impulse pro Minute
* = 1 ml ≙ 1/20 des Thymus(s.O.)

3.3. Die $Ü_{30}$-Wirkung bei intraperitonealer Verabreichung wurde an 13 Tieren (5Kontrolltiere und 8 mit $Ü_{30}$ behandelte Tiere) untersucht. Die Einzelergebnisse und die Mittelwerte zu diesem Versuch sind in Tabelle 8 aufgeführt. In Abb. 3 wird dann die $Ü_{30}$-Wirkung bei i.p.- und i.v.-Gabe verglichen. Bei i.p.-Gabe des Milzextrakts ist keine Hemmung des Zellwachstums zu verzeichnen.
Sowohl die Thymuszellzahl als auch der ^{3}H-Thymidineinbau liegen bei den i.p. mit Extrakt behandelten Tieren sogar höher als bei den Kontrolltieren.

Tabelle 8

Kontrolltiere			$Ü_{30}$-behandelte Tiere		
lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau cpm	Zellzahl/µl*	lfd.Nr. der Tiere	cpm	Zellzahl/µl*
K_1	27429	11775	$Ü_{0,5-1}$	12005	5000
K_2	10824	6500	$Ü_{0,5-2}$	24891	10450
K_3	9281	5900	$Ü_{0,5-3}$	25289	10050
K_4	26775	10800	$Ü_{0,5-4}$	16713	9575
K_5	18174	9575	$Ü_{0,5-5}$	14604	11450
M.W.	18496≙100%	8910≙100%	M.W.	18700	9485
			SD	6068≙33%	2504≙28%
			$Ü_{1,0-1}$	14262	7650
			$Ü_{1,0-2}$	26140	12150
			$Ü_{1,0-3}$	20526	10625
			M.W.	20310	10141
			SD	5941≙32%	2289≙27%

Relation Behandelte (mit 0,5 mg $Ü_{30}$) / Kontrollen = 106,5%
Relation Behandelte (mit 1,0 mg $Ü_{30}$) / Kontrollen = 119,2%

Tabelle 8: Ergebnisse bei i.p.-Gabe von $Ü_{30}$ - Versuch G

K... = Bezeichnung der Kontrolltiere
$Ü_{0,5..}$ = Tierbezeichnung (mit 0,5 mg $Ü_{30}$ behandelt)
$Ü_{1,0..}$ = Tierbezeichnung (mit 1,0 mg $Ü_{30}$ behandelt)
cpm = Impulse pro Minute
M.W. = Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe
SD = Standardabweichung
* = 1 ml ≙ 1/20 des Thymus einer Maus

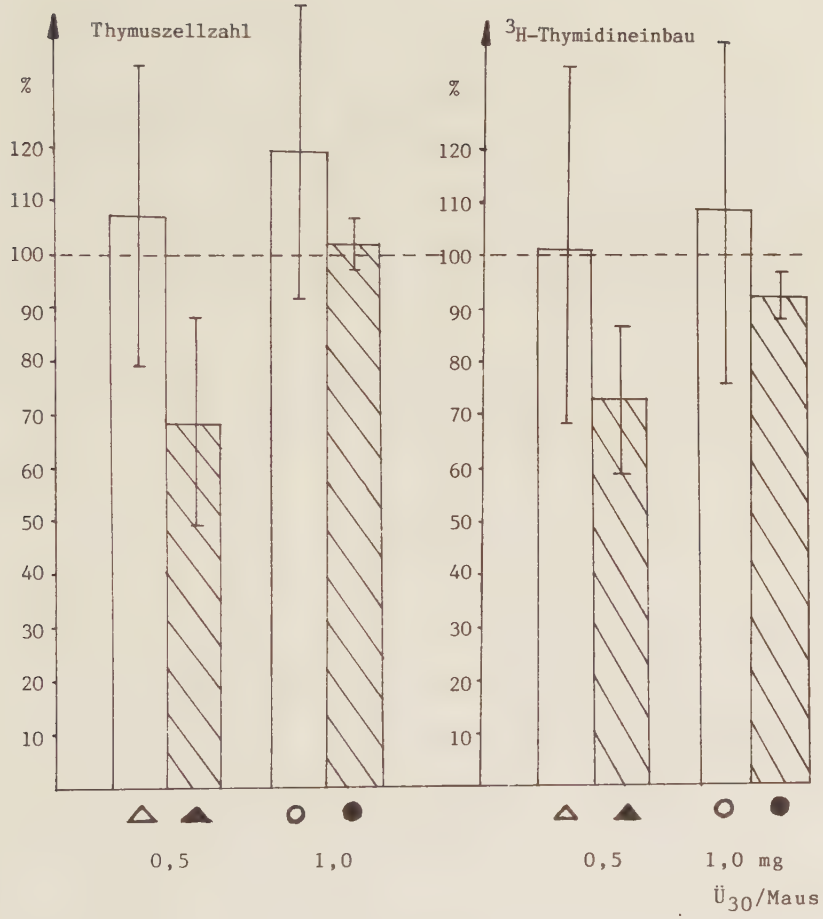

Abb.3: Vergleiche von intraperitonealer und intravenöser Applikation des Milzextraktes Ü$_{30}$. Aufgetragen sind ^{3}H-Thymidineinbau, bzw. Thymuszellzahl in % der Kontrollen.

≙ i.p. △ n = 5 ○ n = 3

≙ i.v. ▲ n = 22 ● n = 8

3.4. Thymuszellkulturen nach in vivo-Behandlung mit $Ü_{30}$

Thymuszellen von 35 Mäusen (Versuch E und F) wurden im Anschluß an die intravenöse Behandlung mit teilweise gereinigtem Milzextrakt im Kulturmedium in vitro weitergezüchtet (vgl. 2.3.). Nach weiteren 5 1/2 Stunden linearen Wachstums war der ^{3}H-Thymidineinbau in diesen Zellen im Vergleich mit den Kontrollzellen um 25,8 - 43,2% dosisabhängig vermindert (vgl. Tab. 9a, 9b, 10, 11 u. Abb.4).

Tabelle 9a

^{3}H-Thymidin-Einbauraten (cpm) in $2,7 \cdot 10^6$ Thymuszellen(Mittelwerte)

Kontrollen			Behandelt mit $Ü_{30}$					
			0,5 mg		1,0 mg		2,0 mg	
V	n	cpm	n	cpm	n	cpm	n	cpm
I	6	147664	4	123059	4	96757	4	91497
II	5	116596	4	76444	4	56699	4	73720

Tabelle 9a: ^{3}H-Thymidineinbau(cpm) in $2,7 \cdot 10^6$ Thymuszellen(Mittelwerte) nach 5 1/2 Stunden in-vitro-Kultur im Anschluß an eine 24-stündige in-vivo-Behandlung.

V = Versuch
n = Anzahl der Versuchstiere
cpm = Impulse pro Minute

Tabelle 9b

^{3}H-Thymidin-Einbauraten (der mit $Ü_{30}$ behandelten Thymuszellen) in % der Kontrollen

V	0,5 mg $Ü_{30}$	1,0 mg $Ü_{30}$	2,0 mg $Ü_{30}$
I	83,3	65,5	62,0
II	65,0	48,0	63,0
Mittelwert aus Versuch I und II	74,2	56,8	62,5

Tabelle 9b: ^{3}H-Thymidineinbauraten in % der Kontrollen nach 5 1/2 Stunden in-vitro-Kultur im Anschluß an eine 24-stündige in vivo-Behandlung mit $Ü_{30}$.

V = Versuchsbezeichnung

Tabelle 10

lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau(cpm) Leerwert	Probe a	Probe b	$\frac{a+b}{2} - L$
K_1	3048	137394	143057	137178
K_2	3515	174183	158812	162983
K_3	3331	131234	140011	132292
K_4	2930	156335	161244	155860
K_5	2764	126499	121365	121168
K_6	2687	176121	182270	176509
M.W.				147664
$\ddot{U}_{0,5-1}$	3980	165859	177342	167621
$\ddot{U}_{0,5-2}$	3476	100550	108787	101193
$\ddot{U}_{0,5-3}$	2499	83685	133245	105966
$\ddot{U}_{0,5-4}$	4689	125733	118563	117459
M.W.				123059
$\ddot{U}_{1,0-1}$	3183	67387	64793	62907
$\ddot{U}_{1,0-2}$	2691	88375	90916	86955
$\ddot{U}_{1,0-3}$	2428	143791	140200	139568
$\ddot{U}_{1,0-4}$	2644	108539	91953	97602
M.W.				96757
$\ddot{U}_{2,0-1}$	2400	79509	79891	77300
$\ddot{U}_{2,0-2}$	2548	81412	91750	84033
$\ddot{U}_{2,0-3}$	3028	126756	104238	112469
$\ddot{U}_{2,0-4}$	2297	97347	91621	92187
M.W.				91497

Tabelle10: ^{3}H-Thymidineinbau(cpm) in $2{,}7 \cdot 10^6$ Thymuszellen(Einzelwerte) nach 5 1/2 Stunden in-vitro-Kultur im Anschluß an eine 24-stündige in-vivo-Behandlung mit $\ddot{U}_{30}$ - Versuch I.

K... = Bezeichnung der Kontrolltiere
$\ddot{U}_{0,5..}$ = Tierbezeichnung(mit 0,5 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\ddot{U}_{1,0..}$ = Tierbezeichnung(mit 1,0 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\ddot{U}_{2,0..}$ = Tierbezeichnung(mit 2,0 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\frac{a+b}{2} - L$ = Mittelwert aus Probe a und b abzüglich des Leerwerts
M.W. = Mittelwert aus der jeweiligen Versuchsgruppe

Tabelle 11

lfd.Nr. der Tiere	^{3}H-Thymidineinbau(cpm) Leerwert	Probe a	Probe b	$\frac{a+b}{2} - L$
K_1	4652	99081	85946	90187
K_2	2997	25175	23883	21532
K_3	3323	229195	193451	209661
K_4	2344	94318	104248	96939
K_5	2320	166995	-	164675
M.W.				116598
$\ddot{U}_{0,5-1}$	1735	9126	6352	6004
$\ddot{U}_{0,5-2}$	2856	37774	39625	35844
$\ddot{U}_{0,5-3}$	1749	83409	84858	82385
$\ddot{U}_{0,5-4}$	2081	155091	193912	172421
M.W.				76444
$\ddot{U}_{1,0-1}$	1937	31067	30226	28710
$\ddot{U}_{1,0-2}$	1928	88716	86882	85871
$\ddot{U}_{1,0-3}$	2172	48583	48344	46292
$\ddot{U}_{1,0-4}$	2185	66066	70158	65927
M.W.				56699
$\ddot{U}_{2,0-1}$	1929	67187	65407	64568
$\ddot{U}_{2,0-2}$	1579	94451	91035	91164
$\ddot{U}_{2,0-3}$	2337	47558	49283	46084
$\ddot{U}_{2,0-4}$	1921	98011	92363	93266
M.W.				73720

Tabelle 11: ^{3}H-Thymidineinbau(cpm) in $2{,}7 \cdot 10^6$ Thymuszellen (Einzelwerte) nach 5 1/2 Stunden in-vitro-Kultur im Anschluß an eine 24-stündige in-vivo-Behandlung mit $\ddot{U}_{30}$ - Versuch II.

K... = Bezeichnung der Kontrolltiere
$\ddot{U}$... = Tierbezeichnung(mit 0,5 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\ddot{U}_{0,5...}$ = Tierbezeichnung(mit 1,0 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\ddot{U}_{1,0...}$ $\ddot{U}_{2,0...}$ = Tierbezeichnung(mit 2,0 mg $\ddot{U}_{30}$ behandelt)
$\frac{a+b}{2} - L$ = Mittelwert aus Probe a und b abzüglich des Leerwerts
M.W. = Mittelwert aus der jeweiligen Versuchsgruppe

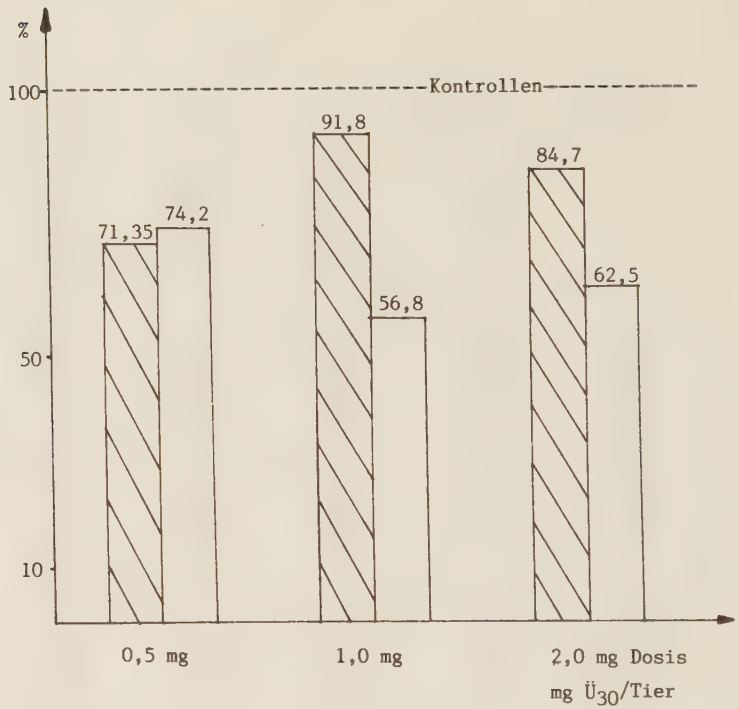

Abb.4: ^{3}H-Thymidineinbau in Thymuszellen in % der Kontrollen. Vergleich der Ergebnisse 24 Stunden nach intravenöser Applikation des Inhibitors mit den Ergebnissen nach weiteren 5 1/2 Stunden Kultivierung ebenso behandelter Thymuszellen in vitro. (Angaben in % der Kontrollen)

Ergebnis in vivo: ▨

Weiterz. in vitro: □

4. DISKUSSION

Nach Skipper ist das ätiologische Agens für das spontane AK-Lymphom ein RNA-Virus, das schon bei der Geburt in der AKR-Maus vorliegt. Die Lymphomzellen treten erstmalig im Thymus von 5 - 12 Monate alten Tieren auf. Zwischen dem ersten Auftreten der Lymphomzellen im Thymus und der klinischen Diagnose (bei etwa 10^9 weit verstreuten sichtbaren, plus nicht sichtbaren Lymphomzellen im Tier) verstreicht eine Zeit von etwa einem Monat. (27) Während der Erkrankung der Mäuse an einem spontanen AK-Lymphom nimmt nach Skipper et al das durchschnittliche Thymus- plus Milzgewicht von normalerweise 150 - 200 g bis zur Diagnosestellung der Leukämie (durch Palpation von Lymphgewebe oder durch Leukozytenzählung) auf 628 mg mittleres Thymusgewicht und 510 mg mittleres Milzgewicht zu.
Die in unseren Versuchen verwendeten Tiere (6-8 Wochen alt) waren noch nicht an einer spontanen Leukämie erkrankt. Mit der Transplantation von Thymuszellen erkrankter Mäuse sollte erreicht werden, daß sich die Leukämiezellen bei allen Versuchstieren zur gleichen Zeit in derselben Phase der Vermehrung befinden.
Bruce et al stellten an Milzzellsuspensionen, die von Tieren eine Woche nach Transplantation von 10^6 lymphoiden Zellen gewonnen wurden, durch mikroskopische Untersuchung fest, daß in diesem fortgeschrittenen Stadium die meisten Zellen maligne entartet waren (3).

Die Gruppe von Bruce konnte bei einer Transplantation von 10^6 Zellen einer AKR - Zellinie zwischen zwei Std. und sieben Tagen nach der Injektion eine exponentielle Zunahme der Kolonie-bildenden Zellen mit einer Verdopplungszeit von 11,3 ± 0,8 Stunden im Thymus zeigen. Er verwendete dazu eine Zellinie, die über vier Jahre hinweg wöchentlich transplantiert wurde. Als Zellen einer Zellinie wiesen diese eine höhere Proliferationsrate auf, als die von uns transplantierten Zellen. Er berichtete, daß die meisten Tiere sieben Tage nach der Transplantation verendeten (3). Skipper et al nehmen nach Überschlagsrechnungen als Verdopplungszeit von Lymphomzellen der ersten Passage in AKR-Mäusen etwa einen Tag an (bei einer Transplantatmenge von 10^2 - 10^6 Zellen), wenn man die Zellen von Tieren im fortgeschrittenen Krankheitsstadium überträgt(30).
Bei Versuchen unseres Labors überlebten die Tiere die Injektion von 2 x 10^6 Zellen im Durchschnitt noch 23,7 Tage (25).
Der maximale Thymidineinbau nach Transplantation von 10^6 Leukämiezellen fand bei Vorversuchen unseres Labors am 3. Tag post transplantationem statt. Zu diesem Zeitpunkt wurde deshalb der ^{3}H-Thymidineinbau in unseren Versuchen gemessen. Vom zweiten auf den dritten Tag post transplantationem wurde den Zellen ^{3}H-Thymidin zum Einbau angeboten. Nach dem 3. Tag wurden die Tiere aufgearbeitet.

Die Ergebnisse des in-vivo-Versuchs, in Abb.3 dargestellt, zeigen folgende Hemmungen des ^{3}H-Thymidineinbaus in Thymuszellen der mit $Ü_{30}$ behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren:

bei 0,5 mg $Ü_{30}$-Dosis: 29,5% - signifikant (p=0,001)
bei 1,0 mg $Ü_{30}$-Dosis: 8,2% - nicht signifikant
bei 2,0 mg $Ü_{30}$-Dosis: 15,3% - nicht signifikant

Der ^{3}H-Thymidineinbau wird von zahlreichen Autoren, u.a. von A.M.Attallah (2) und N.Kiger (18) als Maß für die Zellproliferation genommen.
Dieser Parameter als Maß für das Zellwachstum in vitro bei Chalongabe wird jedoch auch kritisiert.
So meinten Lenfant et al., von den zwei Aktivitätsspitzen eines Rinderleberextraktes enthielte der eine Peak einen Faktor, der leberspezifisch sei und evtl. auf ein Chalon zurückgeführt werden könne, wohingegen die Aktivität des anderen Peaks der Anwesenheit von Thymidin zuzuschreiben sei, so daß das radioaktiv markierte ^{3}H-Thymidin kompetitiv verdrängt würde (19). Auch Houck führt auf, die Gewebsextrakte könnten Nukleotide und Thymidinkinase enthalten. Er meint jedoch, bei Experimenten in vivo sei die Gefahr, daß eine Hemmung der DNS-Synthese durch Kinasen und Nukleotide vorgetäuscht werde, nicht so groß (13). Daß es sich bei unseren Ergebnissen nicht um artefiziell vorgetäuschte Hemmungen der DNS-Synthese handelt, zeigt die Reduktion der Zellvermehrung, die ebenfalls um 30% liegt (30,2%). Diese relativ milde Hemmung entspricht der Theorie eines physiologischen Regulators.

In unseren Versuchen zeigt sich ein großer Unterschied in der mittleren Thymuszellzahl von Tieren, die mit verschiedenen Konzentrationen von $Ü_{30}$ behandelt wurden. (Abb.1).
Auf den ersten Blick erstaunlich ist, daß gerade bei der niedrigsten $Ü_{30}$-Dosierung im Vergleich zu den Kontrollen eine um 30,2% geringere Zellzahl festgestellt wurde. Der 0,5 mg-Wert basiert auf sechs Versuchen von insgesamt 22 mit 0,5 mg $Ü_{30}$ behandelten Tieren (+ 27 Kontrolltieren). In allen sechs Versuchen lag das Zellwachstum der mit 0,5 mg $Ü_{30}$ behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren unter 100%, wie Tabelle 1 zeigt. Trotz einer bei Tierversuchen üblichen großen Streuung (6) war die Hemmwirkung mit $p = 10^{-5}$ hochsignifikant. Die mit 1 mg und 2 mg $Ü_{30}$ behandelten Tiere liegen bezogen auf die Kontrollen um das 100%-Niveau, was daran denken läßt, daß neben Inhibitoren auch Stimulatoren im Milzextrakt vorhanden waren. Möglicherweise ist durch größere Versuche auch bei dieser Anordnung ein Wirkungsnachweis des Extrakts zu erbringen.
Der in-vitro-Versuch im Anschluß an die in-vivo-Behandlung dürfte über die $Ü_{30}$-Wirkung bessere Aussagen zulassen als der in-vivo-Versuch, da hier kaum biologische Gegenregulationen stattfinden konnten und da die Ergebnisse im Gegensatz zum in-vivo-Versuch leichter standardisierbar sind.
Die Ergebnisse (in den Tabellen 9a - 11 aufgeführt) zeigen einen deutlich geringeren ^{3}H-TDR-Einbau der zuvor in vivo mit $Ü_{30}$ behandelten Thymuszellen gegenüber den Kontrollzellen. Diese Thymidineinbauhemmung von:

25,8% bei 0,5 mg $Ü_{30}$-Gabe/Tier
43,2% bei 1,0 mg $Ü_{30}$-Gabe/Tier
37,5% bei 2,0 mg $Ü_{30}$-Gabe/Tier

zeigt, daß die Thymuszellen noch auf irgendeine Art arretiert waren. Es ist möglich, daß die beobachtete Persistenz der Hemmung beim Transfer ins Reagenzglas durch eine feste Bindung des Inhibitors an die Zellen zustande kommt.

Die Zellen könnten bereits durch eine intrazelluläre Blockade arretiert sein oder aber die Inhibitormoleküle könnten an Rezeptoren gebunden sein. Hierfür sprechen auch Versuche von Houck et al (14), in denen die inhibierende Wirkung des Milzfaktors auf diploide Lymphozyten nach Waschen derselben noch immer nachzuweisen war.
Auch Garcia-Giralt et al. machten ähnliche Beobachtungen. Die Milz wurde entnommen, nachdem C57 Bl/6-Mäusen 18 Tage lang 5 mg/Tag eines Milzextraktes i.p. verabreicht worden war. Bei einer sich anschließenden Anzüchtung der Milzzellen in RPMI-Medium wurde eine ^{3}H-TDR-Einbauhemmung der milzextraktvorbehandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen von durchschnittlich etwa 60% nachgewiesen (8).
Als Erklärung für die persistierende Hemmung könnten irreversible zellschädigende Substanzen im Extrakt angeführt werden. Neben IgM- und komplementinduzierter Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen können auch lysosomale Hydrolasen in Gewebsextrakten zu einer Zellschädigung führen(13). Solche Vorgänge spielen im Tierversuch eine geringere Rolle als in vitro. Vor allem aber scheidet bei einem Molekulargewicht unseres Inhibitors von weniger als 50 000 eine Kontamination mit Enzymen aus. Die unbeeinflußte Zellproliferation in Dünndarm und Epidermis (7) macht einen toxischen Wirkungsmechanismus unwahrscheinlich.
F. Marks beschreibt eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation von Basalzellen der Epidermis durch einen lyophilisierten Schweinehautextrakt. Er stellte eine maximale Wirkung (70-80% DNA-Synthesehemmung) durch eine einmalige Injektion von 1 mg/Tier fest. Halbmaximale Hemmung beobachtete er bei etwa 0,5mg pro Tier (20). Nach Abb.1 kann man nicht von einer konzentrationsabhängigen Wirkung des $Ü_{30}$-Extraktes in dem von uns gewählten Dosisbereich sprechen. Es ist möglich, daß man sich mit den Werten 1 mg und 2 mg $Ü_{30}$/Tier schon im Sättigungsbereich befindet.

Nach Houck (14) hat die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Milzextrakt und ^{3}H-Thymidineinbauhemmung in lymphoiden Zellen in vitro die Form einer Sättigungskurve. Daher muß diskutiert werden, daß wir uns schon mit unserer kleinsten Dosis (0,5 mg/Tier) im Vollwirkspiegel befanden, und daß deshalb keine Dosisabhängigkeit mehr nachzuweisen ist. Einzelne Versuche mit niedrigen Dosen (0,1 mg $Ü_{30}$/Tier) legen nahe, daß in niedrigeren Konzentrationen eine Dosisabhängigkeit besteht. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, diese Ergebnisse durch eine größere Versuchstierreihe zu untermauern. Die in-vitro-Untersuchung gibt jedoch weitere Anhaltspunkte für eine Dosisabhängigkeit (s.u.) Eine Sättigungskurve könnte mit der Rezeptorentheorie erklärt werden. Eventuell im Substanzengemisch enthaltene Stimulatoren könnten so in höheren Dosen auch stärker zum Tragen kommen. Für die Annahme, daß wir uns mit der Dosis von 0,5 mg $Ü_{30}$/Tier schon im Vollwirkspiegel befanden, spricht auch der Vergleich der Ergebnisse aus dem in-vivo-Versuch mit denen des sich an den Tierversuch anschließenin-vitro-Versuchs (Abb.4). Der in-vivo-Versuch gibt die Ergebnisse 24 Stunden nach der Injektion wieder, während der sich ihm anschließende in-vitro-Versuch die Ergebnisse 24 + 5,5 Std. = 29,5 Std. nach $Ü_{30}$-Injektion zeigt. Es fällt auf, daß in niedrigen Konzentrationen des Milzextraktes die Hemmung des Thymidineinbaus nach 29,5 Std. geringfügig niedriger ist als nach 24 Std. (nicht signifikant). Dagegen steigt bei höherer Inhibitordosis die Hemmung nach 29,5 Std. noch weiter an.
Zwar ist zu berücksichtigen, daß die große Streuung eines Tierversuchs (24 Std.) bei der in vitro-Weiterzüchtung (29,5 Std.) wegfällt.

Trotzdem können die scheinbar inkongruenten Ergebnisse dieser beiden Versuche vorsichtig interpretiert werden: Die auf Grund der Dosis-Wirkungsbeziehung postulierten stimulierenden Substanzen im Extrakt (s.o.) scheinen nicht so fest an die Zellen gebunden zu sein wie der Inhibitor, so daß sie beim Transfer ins Reagenzglas nicht mitgenommen werden. Dadurch wird jetzt die dosisabhängige Wirkung des Inhibitors augenscheinlich, sozusagen "demaskiert".

Abb.2 zeigt in den ersten 8 Stunden eine zu vernachlässigende Wirkung des Kalbsmilzextraktes von 0,075% Hemmung des Thymidineinbaus/h (artefizieller Mittelwert) gegenüber 1,24% Hemmung/h 8 - 24 Stunden nach der $Ü_{30}$-Injektion. Das würde mit den Ergebnissen in Einklang stehen, die E.Heidemann et al. (12) bei der Einwirkung von $Ü_{30}$ auf MKT-Ch-Zellen in vitro feststellten. Sie konnten nach frühestens 8 Std. eine Hemmung nachweisen. Die MKT-CH-Zellen haben mit 27 Std. eine ähnliche Zyklusdauer wie die in diesem Versuch transplantierten Lymphomzellen in AKR-Mäusen - nach Skipper etwa 24 Std. (27). Auch die Ergebnisse von Marks bei der Prüfung der Hemmwirkung eines Schweinehautextraktes auf die DNA-Synthese von Mäuseepidermis sind mit unseren Beobachtungen vergleichbar. Er wies nach einer Latenzperiode von 5 Std. einen Hemmungspeak zwischen 10 und 20 Std. nach, und stellte 20 bis 40 Std. nach Gabe des Extraktes ein Abnehmen auf das Kontrollniveau fest (20). Um über die Zeit-Wirkungs-Abhängigkeit genauere Vorstellungen zu bekommen, müßten Messungen in kürzeren Zeitabständen gemacht werden. Es müßten auch Werte über den 8 - 24 Std.-Bereich hinaus bestimmt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Sicher kann jedenfalls gesagt werden, daß eine Wirkung des Extraktes 8 Std. nach Extraktbehandlung noch nicht eintritt, während eine solche nach 24 Std. zu beobachten ist.

Bei intraperitonealer (i.p.) Gabe von $Ü_{30}$ ist keine Hemmung des Thymidineinbaus zu verzeichnen, - wie die Ergebnisse des Versuchs G, in der Tabelle 8 aufgeführt, zeigen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Chung und Hufnagel (5), sowie von Garcia-Giralt (8,9) die bei intraperitonealer Verabreichung die Wirksamkeit ihres Extraktes nachweisen konnten. Wenn man die Versuche mit i.v.-Gabe des $Ü_{30}$ zum Vergleich heranzieht(Abb.3), so muß man davon ausgehen, daß die Hemmsubstanz durch das Peritoneum nicht, oder nur in sehr kleinen Mengen resorbiert oder in der Leber metabolisiert wird. Es ist jedoch die geringe Tierzahl dieses Versuchs zu berücksichtigen.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes mit dem Charakter eines Lymphozytenchalons wurde an 6 - 8 Wochen alten AKR-Mäusen, denen zuvor syngene Leukämiezellen transplantiert worden waren, untersucht.
Als Parameter für die Thymuszellproliferation wurden die Thymuszellzahl und der ^{3}H-Thymidineinbau (in die Thymuszellen) bestimmt. Zudem wurde nach einer 24-stündigen Einwirkungszeit des Extraktes auf die Thymuszellen in vivo durch einen sich anschließenden in-vitro-Versuch die fortgesetzte Proliferationshemmung dieser Zellen gemessen.
Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Bei i.p.-Gabe des Extraktes konnte keine Proliferationshemmung von Thymuszellen der behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden.
- Bei i.v.-Gabe des Extraktes liegt eine zeitabhängige Wirkung auf den ^{3}H-Thymidineinbau von Thymuszellen vor; nach 8 Std. war keine Hemmung des Thymidineinbaus, nach 24 Std. dagegen eine Hemmung von 29% zu verzeichnen. Die Vermehrung der Zellzahlen wurde in demselben Maße reduziert.
- Die sich an die in vivo-Behandlung anschließende Weiterzüchtung der Thymuszellen in vitro zeigte eine deutlichere Inhibition. Die Zellen der extraktbehandelten Tiere bauten durchschnittlich 39% weniger Thymidin ein als die Zellen der Kontrolltiere.
  Auf Grund dieser in-vitro-Weiterzüchtung der in vivo mit Milzextrakt behandelten Zellen läßt sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung in Form einer Sättigungskurve annehmen.

Dieselben Versuche zeigen, daß der Inhibitor fest an die Zielzellen, eventuell über einen Rezeptor, gebunden wird. Begleitende stimulierende Substanzen im teilweise gereinigten Milzextrakt scheinen nicht so fest gebunden zu werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ATTALLAH,A.M.: Regulation of cell growth. In: Chalones (Houck, J.C.,Ed.). Amsterdam-Oxford: North-Holland publishing Company/New York: American Elsevier publishing Company, 141-171, (1976).

2. ATTALLAH, A.M. and HOUCK, J.C.: Lymphocyte chalone. In: Chalones (Houck, J.C., Ed.). Amsterdam-Oxford: North-Holland publishing Company/New York: American Elsevier publishing Company, 359-383, (1976).

3. BRUCE, W.R. and MEEKER, B.E.: Dissemination and growth of transplanted isologous murine lymphoma cells. J.Nat. Cancer Inst. 32, 1145-59, (1964).

4. BULLOUGH, W.S. and LAURENCE, E.B.: The control of epidermal mitotic activity in the mouse. Proc. Roy. Soc. B 151, 517-536 (1960).

5. CHUNG, A.C. and HUFNAGEL, C.A.: Some in vivo effects of chalone (mitotic inhibitor) obtained from lymphoid tissues. Nat. Cancer Inst. Monogr. 38, 131-134 (1975).

6. COHRS, P., JAFFE, R., MEESEN, H.: Pathologie der Laboratoriumstiere
Springer Berlin, Göttingen, Heidelberg (1958).

7. GANSER, H.: Wirkung eines teilweise gereinigten Kalbsmilzextraktes (Lymphozytenchalon) auf die Zellproliferation in Lymphknoten, in Dünndarmepithelien und in Epidermiszellen, so wie auf das Blutbild von AKR-Mäusen. Dissertation: Fachbereich Klinische Medizin der Universität Tübingen (1981).

8. GARCIA-GIRALT,E., DIAZ-RUBIO, E. and RAPPORT, H.: Evaluation of the specifity of a lymphoid chalone. Cell Tissue Kinet. 8, 589-592 (1975).

9. GARCIA-GIRALT, E., LASALVIA, E. and MATHE, G.: Evidence for a lymphocyte chalone. Eur. J. Clin. Biolog. Res. 15, 1012 (1970).

10. GARCIA-GIRALT, E., MORALES, V.H., BIZINI, B. and LASALVIA, E.: Prevention of graft versus host reaction by incubation of lymphoid cells with a splenic extrakt (not affecting the repopulation of the haematopoetic tissue). Cell Tissue Kinet, 6, 567-571, (1973).

11. GARCIA-GIRALT, E., MORALES, V.H., LASALVIA, E. and MATHE, G.: Suppression of graft versus host reaction by a spleen extrakt. J. Immunol. 109, 878 (1972).

12. HEIDEMANN; E., JUNG, A., WILMS, K.: Gewebsspezifische Hemmung der Lymphozytenproliferation durch Milzextrakt (Lymphozytenchalon), Klin. Wschr. 54, 221-226, (1976).

13. HOUCK, I.C., and HENNINGS, H.: Chalones-Specific Endogenous Mitotic Inhibitors, FEBS Letters 32, 1-8, (1973).

14. HOUCK, I.C., IRAUSQUIN, H.: Somme properties of the lymphocyte chalone. Nat. Cancer Inst. Monogr. 38, 117-122, (1973).

15. HOUCK, I.C., IRAUSQUIN, M. and LEIKIN, S.: Lymphocyte DNA synthesis inhibition. Science 1973, 1139, (1971).

16. IVERSEN, O.H.: The history of chalones. In: Chalones (Houck, J.C., Ed.). Amsterdam-Oxford: North-Holland publisching Company / New York: American Elsevier publishing Company 1976.

17. JONES, I., PARASKOVA-TCHERNOZENSKA, E. and MOORHEAD, I.: In vitro inhibition of DNA synthesis in human leukemic cells by a lymphoid cell extrakt. Lancet, March 28, 654 (1970).

18. KIGER, N., FLORENTIN, J. and MATHE, G.: Some effects of a partially purified lymphocyte-inhibiting factor from calf thymus, TRANSPLANTATION, 448-453, (1972).

19. LENFANT, M., KREN-PROSCHEK, L. and VERLY, W.G.: Thymidin as one of the factors in a beef liver extract decreasing 3-H-thymidine incorporation into DNA.Can. J. Biochem. 51, 1973.

20. MARKS, F.: Direct evidence of two tissue specific chalone like factors regulating mitosis and DNA-synthesis in mouse epidermis. Hoppe-Seyler's Z. Physiolog. Chem. 352, 1273-1274 (1971).

21. MAURER, H.R.: Chalone: Regulationsstoffe des Organwachstums bei Mensch und Tier. Pharmazie in unserer Zeit, 2, 181-196 (1973).

22. METCALF, D., WIADROWSKI, M.: Autoradiographic analysis of lymphocyte proliferation in the thymus and in thymic lymphoma tissue
Cancer Research 26, 483-491 (1966).

23. MOORHEAD, I.F., PARASKOVA-TCHERNOZENSKA, E., PIRRIE A.I. and HAYES, C.: Lymphoid inhibitor of human lymphocyte DNA synthesis and mitosis in vitro.
Nature 224, 1207 (1968).

24. OMINE, M., PERRY, S.: Use of cell separation at 1 g for cytokinetic studies in spontaneous AKR leukemia
J. Nat. Cancer Inst. 48, 697-704 (1972).

25. RUTSCH, H.: Wirkung eines Milzextraktes(Lymphozyten-chalons) auf die Überlebenszeit und die Vergrößerung lymphatischer Leukämie. Dissertation: Fachbereich Klinische Medizin der Universität Tübingen(1979).

26. SIMMS, M.S. and STILLMAN, N.P.: Substances affecting adult tissue in vitro. II. A growth inhibitor in adult tissue. J. Gen Phyiol 20, 621-629 (1937).

27. SKIPPER, H.E., SCHABEL, F.M.JR., TRADER, M.W., LASTER, W.R.JR., SIMPSON-HERREN, L. and LLOYD, H.H.: Basic and therapeutic trial results obtained in the spontaneous leukemia(lymphoma) model - end of 1971. Cancer Chemother. Rep. Part 1, Vol 56, 273-295 (1972).

28. WILK, W.: Anforderungen an die Haltung von Versuchstieren. In: Grundinformationen über Versuchstierfragen der DFG, Kommission für Versuchstierforschung, Mitteilung I, 29-37 (1971).

29. WINNE, D.: Zur Auswertung von Versuchsergebnissen: Die verteilungsfreien Rangteste von Wilcoxon. Arzneimittelforschung 14, 119-120 (1964).

LEBENSLAUF

Am 28.5.1949 wurde ich, Friedrich Wörz, als Sohn des Landwirts und Waldarbeiters Arthur Wörz und seiner Ehefrau Eva Wörz, geb. Götz in Bad-Urach-Hengen, Kreis Reutlingen geboren.
Von 1956 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Bad-Urach-Hengen. Es folgten eine landwirtschaftliche Lehre und der Besuch der Landwirtschaftlichen Fachschule für ein Semester. Danach besuchte ich die Landwirtschaftliche Berufsaufbauschule in Nürtingen für ein Jahr und das "Staatliche Institut zur Erlangung der Hochschulreife" in Stuttgart für drei Jahre. Am 14. Juni 1972 Ablegung des Abiturs.
Im Wintersemester 1972/73 begann ich mein Medizinstudium in Tübingen. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im März 1975 ab, den ersten Teil der ärztlichen Prüfung im März 1976 und den zweiten Teil 1978. Mit Abschluß des dritten Teils der ärztlichen Prüfung am 7.5.1979 beendete ich mein Medizinstudium.
Der experimentelle Teil der vorliegenden Untersuchung fiel in die Jahre 1976/77.
Seit Mai 1979 bin ich mit der Erzieherin Inge Wörz, geb. Holzapfel aus Herrenberg verheiratet.

Druck Köhler Tübingen